

Novel antibodies and methods for their use.

Publication number: JP6506827 (T)

Publication date: 1994-08-04

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: A61K39/395; A61K47/48; C07K16/46; C12M1/34; C12N5/10; C12N15/02; C12P21/08; G01N33/536; G01N33/542; G01N33/543; C12R1/91; A61K39/395; A61K47/48; C07K16/46; C12M1/34; C12N5/10; C12N15/02; C12P21/08; G01N33/536; G01N33/543; (IPC1-7): C12P21/08; A61K39/395; A61K47/48; C12M1/34; C12N5/20; C12N15/06; G01N33/536; C12N5/20; C12R1/91

- European: A61K47/48T4B46D; C07K16/46D; G01N33/542; G01N33/543B

Application number: JP19920508633T 19920424

Priority number(s): GB19910008954 19910426; GB19920007192 19920401; WO1992GB00769 19920424

Also published as:

JP3431140 (B2)

EP0511011 (A1)

EP0511011 (B1)

US5573920 (A)

NZ242510 (A)

[more >>](#)

Abstract not available for JP 6506827 (T)

Abstract of corresponding document: EP 0511011 (A1)

This invention relates to antibodies and is particularly, though not exclusively, concerned with diagnostic and therapeutic methods using monoclonal, bi- or tri-specific antibodies. The invention also provides a method in which binding of a first antigen to a first antibody antigen binding site cause release of a second antigen from an adjacent second antibody antigen binding site.

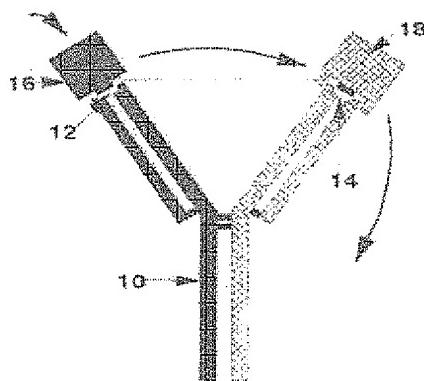


Figure 1

Data supplied from the esp@cenet database --- Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-506827

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)8月4日

(51) Int.Cl.⁵

識別記号

序内整理番号

P I

C 12 P 21/08

8214-4B

A 6 1 K 39/398

9284-4C

47/48

7633-4C

8412-4B

C 12 N 5/00

B

9050-4B

15/00

C

審査請求 替請求 予備審査請求 有 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特表平6-506827

(71) 営業人 サーフィス・アクティブ・リミテッド
イギリス国、エイボン、プリストル、ハーベリー・ロード、ヘンリーズ・ハウス、ホウトン・ストーン(番地なし)

(22) 出願日 平成4年(1992)4月24日

(72) 発明者 ランドル、ペヴァリー・ジェーン
イギリス国、ビーエス&2エックスエル、エイボン、プリストル、アッパー・ブルグレイブ・ロード 19

(23) 翻訳文提出日 平成5年(1993)10月26日

(74) 代理人 弁理士 會税道照(外6名)

(24) 国際出願番号 PCT/GB92/00769

(25) 同様公開番号 WO92/19973

(26) 國際公開日 平成4年(1992)11月12日

(31) 優先権主張番号 9108954.0

(32) 優先日 1991年4月26日

(33) 優先権主張國 イギリス(GB)

(34) 優先権主張番号 9207192.7

(35) 優先日 1992年4月1日

(36) 優先権主張國 イギリス(GB)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 沈体およびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は抗体に関するものであり、かつ詳細には、これに制限されるものではないが、モノクロナール抗体、2特異的抗体または3特異的抗体を使用した診断用および治療用の方法に関する。また、本発明は、第1の抗原の第一抗体抗原結合部位への結合が隣接する第二抗体抗原結合部位からの第2の抗原の放出を引き起こす方法も提供する。

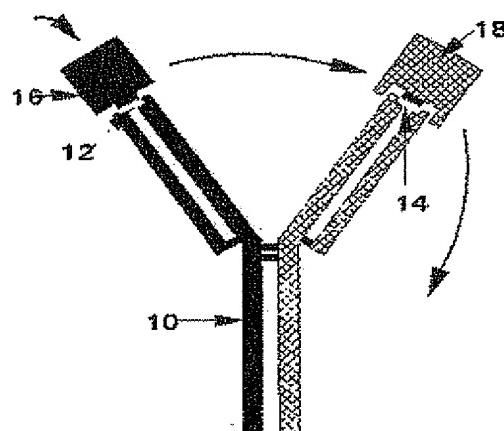


表 平6-506827 (2)

試験の範囲

1. 第1の抗体の第一抗体活性部位部位への結合が競争する第二抗体抗原結合部位からの第2の抗体の放出を引き起こす、抗原からの抗体放出方法。
2. 前記第一および第二抗体抗原結合部位が同一の結合により固定される、記載しに記載の方法。
3. 前記抗体が2特異的抗体、3特異的抗体または他の多特異的抗体である、請求項2に記載の方法。
4. 前記第一および第二抗体抗原結合部位がそれぞれ第1および第2の抗体により提供され、請求項1に記載の方法。
5. 在体注入した試験管内で実現される試験管、治療用または容差用の方法である、請求項1～4のいずれかひとつに記載の方法。
6. 前記第2の抗体が酵素または他の活性可能なマーカーである、請求項1に記載の方法。
7. 前記第2の抗体が治療作用風である、請求項1に記載の方法。
8. 前記第一および第二抗体抗原結合部位が、 2×10^{-10} ml/ml を超える蛋白抗原で表面に結合された、1つの抗体または第1および第2の抗体により固定される、請求項1に記載の方法。
9. 制御抗体が $5.0 \sim 1.00 \text{ mg/ml}$ の蛋白濃度で表面に結合されている、請求項目に記載の方法。
10. 前記表面がマイクロタイタートレーのウエルの表面である、請求項10に記載の方法。
11. 前記表面が第一および第二抗体抗原結合部位に不活性酵素で結合しているかまたは酵素結合部位に結合することにより不活性となり、かつ上の抗原の第一抗体抗原結合部位への結合の後に活性を活性化して放出される、請求項1～10のいずれかひとつに記載の方法。

一方の抗原前駆体が存在するとときに活性となる酵素前駆体である、請求項1～7に記載の治療用の方法。

1.9. 第1および第2の酵素がそれぞれ第一および第二抗体結合部位から活性部位で放出されるが、この通り、これら2つの放出される酵素は表面にもう一方の酵素の存在下で反応を活性化するものである、請求項1～13に記載の方法。

2.0. 抗原および酵素に対する結合部位を有し、該酵素の結合への結合は酵素を不活性とする多特異的抗体と反応とを促進させ、その物質表面の該抗体への結合が酵素本体の酵素基質の活性部位での活性をもたらすこと、ならびに試験中の前駆酵素の存在を示す前駆放出される酵素の活性を検出することを目的とした前駆酵素の存在または不活性を観察するための免疫検定方法。

2.1. 前記抗体が2特異的抗体である、請求項2に記載の方法。

2.2. 前記酵素がその活性部位により抗体と結合される、請求項20または21に記載の方法。

2.3. 前記抗体が酵素活性部位または蛋白質である、請求項20～22のかいずれかひとつに記載の方法。

2.4. 前記酵素が、ヨーラクトレタービー、グルコースオキシダーゼ、ワラーバーゼ、乳酸脱水素酶、またはホースラディッシュペルオキシダーゼである、請求項20～23のいずれかひとつに記載の方法。

2.5. 酵素が抗体への結合により不活性とされ、そして抗原の抗体への結合の後に活性化部位で放出される、抗体がより容易に付する結合部位を有する多特異的抗体。

2.6. 前記多特異的抗体が2特異的抗体である、請求項2.5に記載の多特異的抗体。

2.7. 酵素活性物質蛋白質および酵素に対する結合部位を有し、該酵素の抗体への結合が該酵素を不活性とする多特異的抗体と反応させ、その酵素活性物質蛋白質の該抗体への結合が該抗体からの酵素基質の活性部位での活性をもたらすこと、ならびに該抗体の酵素活性部位蛋白質の活性を示す前記酵素の活性を検出することを目的とした前駆酵素を検出する方法。

1.2. 前記第2の抗体が酵素または他の治療作用風。酵素または他の治療作用風である、請求項1に記載の方法。

1.3. 前記第2の抗体の第二抗体結合部位からの放出を引き起こす、該抗体が第2の抗体または酵素の抗原結合部位への結合が起こり、それにより、隣接する第四抗体抗原結合部位からの酵素部位に結合している第3の抗体の放出を引き起こす、請求項1～12に記載の方法。

1.4. 治療用マーカーおよび酵素または他の活性可能なマーカーを診断用インジケーターにそれぞれ付ける第一および第二抗体結合部位が色を有し、抗体への結合が和諧酵素または他の活性可能なマーカーを不活性にする第1の抗体。該酵素または他の活性可能なマーカーあるいは酵素または他の活性可能なマーカーの反応性抗体、あるいはそれをより軽減される反応の反応性生物に対する第一抗体結合部位と酵素または他の活性可能なマーカーに対する第二抗体結合部位を示す第2の抗体をそれぞれ含み、前記第2の抗体が酵素または他の活性可能なマーカーの放出を引き起こす。そして、該酵素または他の活性可能なマーカーが前記第2の抗体との結合に結合して、結合した酵素または他の活性可能なマーカーが前記第2の抗体からの放出を引き起こす、請求項1～12に記載の方法。

1.5. 治療用マーカーに方向付けられた第一抗体結合部位、インジケーター酵素が方向付けられた第二抗体結合部位、および不活性を形態で示される結合した前記第一抗体の結合部位の治療作用風を有する第三抗体結合部位を含む、請求項1～12の方法に係るこれらの多特異的抗体。

1.6. 細胞または酵素表示マーカーである第1の表面に方向付けられた第一抗体結合部位ならびに酵素または他の治療作用風に方向付けられた第二抗体結合部位を有し、第1の抗体の第一抗体結合部位への結合が第二抗体結合部位から前記後者部位の放出を引き起こす、多特異的抗体。

1.7. 前記酵素または他の治療作用風が不活性な形態で前記第二抗体結合部位に結合するか結合後に活性化を示す第三抗体結合部位を含む、請求項1～16のいずれかひとつに記載のキットまたは多特異的抗体。

1.8. 一つの抗体結合部位から四種の酵素が放出され、そして別の部位から別の酵素が放出されるが、このとき、これらの酵素活性は互いに違う。

2.8. 前記抗体が2特異的抗体である、請求項2.7に記載の方法。

2.9. 前記酵素がヨーラクトレタービーである、請求項2.8に記載の方法。

3.0. S-P-Aおよび酵素に対する結合部位を有し、該酵素の抗体への結合が該酵素を不活性とし、S-P-Aの抗体への結合が酵素からの酵素活性の活性を活性部位での活性をもたらす。請求項2.7～29のいずれかひとつに記載の方法または多特異的抗体。

3.1. 前記抗体が、グレベスト表面の表面抗体に親和性を有し、表面、ポートングランの欧洲動物細胞培養コレクションに変性酵母 82042211 として販売されている細胞株ならびに、上に上に記載される方法である、請求項2.7～3.9のいずれかひとつに記載の方法または抗体。

3.2. 第一および第二抗体結合部位を含み前記抗体がバイオセンサの表面に結合される、請求項1～5.2のいずれかひとつに記載の診断用の方法または免疫検定方法に使用するためのバイオセンサ。

3.3. 請求項1.6または1.7に記載の多特異的抗体ならびに前記抗体に結合した酵素または他の治療作用風を含むキット。

3.4. ブラベスト表面の表面抗体に親和性を有し、表面、ポートングランの欧洲動物細胞コレクションに変性酵母 82042211 として販売されている細胞株ならびに 3.0. 1.9.

明細書

抗体およびその使用方法

本発明は抗体に関するものであり、かつ詳細には、これに制限されるものではないが、モノクローナル抗体、あるいは2特異的 (bispecific) または多特異的 (trispecific) 等の多特異的 (multispecific) 抗体を用いた診断用および治療用の方法に関する。

モノクローナル抗体は多くの抗体検査において開拓された技術であり、その検出能力を完全には発揮していない。此物の精巧な技術でさえ、洗浄工程と手作業による数多くの段階の操作を必要とする。広い外野に適応する工程のシステムが必要とされている。

モノクローナル抗体はまた、疾患の治療においても用途を見出されていない。例えば、体内の腫瘍を対象および治療するために、抗体蛋白に付着された、リシンおよび酸性性残基を含む、連結物質で腫瘍を破壊するモノクローナル抗体複合体が使用されている。

モノクローナル抗体技術により2特異的抗体が開拓されつつあり、2特異的抗体クローリングの例では、各々の2特異的抗体が複数の異なる2つの抗原結合部位を有している。2特異的抗体は、それ自身目的的 (inherent) 抗体に対するモノクローナル抗体を分離する名前ハイブリドームを結合して、既に“ハイブリドーム (polyclonal)” と呼ばれる、11つの抗体ハイブリドームまたは“ヒューバーマ (Jesoma)” を形成することにより認証される [Songcivirat, S and Sonnenburg, F.J. (1990) *Clin Exp Immunol* 72, 815, and Street, R.R. et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7069 and GB 2309921A]。既ハイブリドームは抗体活性不活化可能な凝集活性の除去により取り除くことができる [De Lau, S.H. et al. (1988) *J. Immunol Methods* 127, 1]。最初に製造された2特異

および2特異的抗体等の、1つより多い抗原結合部位を有する抗体全てを包含する。第一部位への他の分子の結合を有する第二部位からの結合分子の放出は、抗体伴介信号伝導 (antibody-mediated signal transduction) と名付けることができる。本文中で用いられる“抗体”という術語は、IgG、IgA、IgM、IgDおよびT細胞の先駆プロテリン、ならびに自然に生じる抗体または組換えDNA技術または他の類似の方法等により製造される抗体の抗原結合部位を有する他の蛋白質を含む。

本発明者は、非常に高い精度、準確的な測定が可能的には1~2 pg/ml であるのにに対し、現存の10~100 pg/ml よりも低い濃度でマイクロライタートレー (microtitre tray) 上に抗体がコーティングされると、ある抗体抗原結合部位が隣接する第二抗体抗原結合部位に結合した他の抗原の放出を引き起こすほど隣接する抗原結合部位が非常に近接して配置されるという、驚くべき知見を得た。好ましい免疫反応において、発現濃度は、約2 pg/ml、得やすくは約50 pg/ml よりも低い蛋白質濃度で本発明に抗体を結合させることを示す。

第2の結果は第二抗体抗原結合部位に直接作用形態で結合され、そして第1の抗体が第一抗体抗原結合部位へ結合する際には活性化が抑制されることができ。第2の抗体は、第1または他の他の活性化作用素、酵素または他の活性化部位マーカー、あるいは活性化蛋白質であることができる。この発明は、例えば、ヨウガラクトンゲーゼなどはウエアーゼであることができる。

モノクローナル抗体は在治薬剤の作用をブロッキングする機能を持っている。例えば、抗体O-1は強い抗凝固剤であるマイトサントロン (nitroarginine) の細胞作用を抑制する [Flavell, S.H., Flavell, D.J. (1991) *Br J Haematol.*, 78, 820-3]。本発明によると、実際に方向付けられた結合部位を1つ抑え、その表面を不活性にする2特異性抗体は、この2特異性抗体の第二抗原結合部位が方向付けられている分子の発現部位において活性化を抑制することができる。

第二抗原結合部位からの抗原の放出は、放出された抗原、例えば、酵素または他の結合分子の、あるいは酵素を有するならばその反応性物質の1つ。例えば、放出された抗原により誘導された反応性物質の、隣接する抗体上の第三部位における酵素を誘導することができ、それにより、隣接する第四抗原結合部位からの第三の結合抗原の放出を引き起こすことができる。

抗体は複数の免疫検査に用いられた (Nilstein L., von Eulen A.C. (1983) *Nature* 305 697)。この抗体は、モノクローナル抗体を分泌する細胞と先述のマウスからの詳説細胞とを結合することにより製造された。第一結合部位は目的物質に特異的であった。勝利の結合部位である第二結合部位はマーカー酵素に特異的であった。酵素に付加された免疫標記は、指定濃度、恒守に対するノイズの減少、褐色処理の簡略化、および感度増進活性の保存を増加させた。

2特異的抗体は、抗原との結合を抑制する。酵素に対する免疫酵素反応を因縁とする [Corvera JP, et al. (1987) *Cancer Research* 47 3821]。あるいは免疫活性キラー細胞上の細胞抗原と細胞表面とを交叉連絡させる [Hita T., et al. (1989) *Lenses* 825 888 and Fanger ME and Currie JW, Tillett S. 876-880 (1981)] 等の新しい治療方法において広範な用途が見出されている。之が実現されたより非特異的抗体の、化学的リンクージ等のその他の製法は、後者の論文において紹介されている。

WO 90/07714 明細書は、ある酵素が2特異的抗体と結合することにより、熱変性に対して安定化される先駆構造を示示している。

WO 91/09134 明細書は、不活性抗原結合部位をその活性化形態に変換する酵素とセト酸脱水素の双方と結合し得る2特異的抗体を開示している。この抗体と酵素とを含む免疫複合体は、不活性を医療和载体と共に癌患者には手術、或は小脳の副腎用免疫細胞を直接的に投与することができる。この酵素は活性な酵素を活性化して抗体に結合している。また、ポリドーマの製造方法も開示されている。

本発明の目的の1つは、既存の免疫検査法よりも反応工程数の少ない、対しましては工程のみを含む免疫検査法を提供することである。

本発明の1つの特徴によれば、ある抗原が1つの抗体結合部位に結合するところが、隣接する第二抗体抗原結合部位からの別の抗体の放出を引き出す方法が提供される。細胞による操作を行わせるものではないが、所たる抗原と結合している抗体との間の立体障壁が、結合している抗体の第二抗体抗原結合部位からの放出を引き起こすのであると本発明者は推察している。第一および第二抗体抗原結合部位は、同一の多特異的 (multispecific) 抗体または相違する別の中により誘導されることがある。“多特異的” という術語は、2特異的抗体を示す。

致頸用多特異的抗体は、第2の“治療” 腹腔特異的抗体における治療用作用の並進を説明することができるが、それは、該用インジケータの第1の抗体の第一結合部位への結合が第2の抗体の第二結合部位にすでに結合していた群系の放出をもたらし、この放出された群系またはその反応性酵素の1つが第2の抗体に結合し、そして次に、この二番目の結合群系 (event) が第2の抗体に結合されている健康正常細胞の放出を引き起こす、をスケードが図示による。群系の反応性酵素の結合は、初期結合信号の増幅を止めめて、好ましいことである。やはりスケード作用により動作する群系/治療用の3特異的抗体では、第一抗体結合部位が診断用マークーに方向付けられ、第二抗体がインジケータ酵素に方向付けられ、そして第三抗体結合部位が不活性な形態で治療用作用部を抱うことができる。抗体をその用途に適するように較えることが可能であることは理解されよう。例えば、1.0の死を多量用工程を待機する I g M 抗体が純粋である。

好ましい免疫検査においては、ある抗原結合部位が、臓器酵素の活性部位または治療用作用部の作用だとて特異的な分子成分等のインジケータ/治療の活性部位あるいはその近傍における分子結合により、不活性な酵素で抑制されることは治療用の作用部を保護する。抗体結合において、第二抗体結合部位は、底液または抗体結合部位を示すマーカー等の抗体結合分子に対しても方向付けられる。このマーカーの存在下に、不活性な形態で保持された群系が、2つの異なる抗体抗原結合部位の結合を近傍による活性酵素の結合として、活性酵素を放出される。治療用結合においては、結合された不活性作用素が、既存の試験用対象の試験用分子または他の抗体が抗体を抑制している場合、ウイルスまたは他の反応物に包まれた分子または他の抗体の活性により放出されることができる。

本発明の抗体の治療用の使用は、さらに以下のことを含むする。
海水、酵母の吸引液、消化液の吸引液、血漿、妊娠切片中のS-マークの測定。

S-P-Aの存在をまたは低いレベルがリスクを負す、妊娠切片中のS-P-Aのリスクの評価。

RDSを患児および成人RDSの成人患者における即接細胞の活性化。S-P-Aの増加したレベルが正常な評価範囲を示す。

人工免疫活性的質置換治療の首尾の監視。即接細胞の状況の監視はS-P-Aの状況により判定付けられる。

異なる抗体からの2つの異なる結合分子の数比は、双方の抗体分子が存在するときのみ起こる反応を起こすことができる。反応生成物は、差質の差異を説明する別の抗体と結合することができるが、該抗体とは、その抗体に結合した治療用または診断用分子等である。治療用において、両方の治療用抗体が存在するときに活性剤を投与をとり、そのときにのみ治療のために活性となる2つの活性剤抗体が投与されることがある。例えば肿瘤の治療において、第1の2特異的抗体は、多くの肿瘤細胞のインジケーターである即ち表面标志物アセチル化(S-P-A)に対して方向付けられた第一抗体結合部位、および処理前親抗体に対して方向付けられた第二抗体結合部位を有する。第2の2特異的抗体は、免疫原性尾部生長のインジケーターであるトランシスフェリン受容体に対して方向付けられた第一抗体結合部位、および免疫用抗体、即ち標的親抗体Bに対して方向付けられた第二抗体を有しているが、標的親抗体Bとは結合して活性な免疫複合体となる。結合された両親抗体BとともにBを有する2つの抗体を含むカクテルを肿瘤患者の治療に使用すれば、S-P-Aとトランシスフェリン受容体の存在下で表面标志物Aと結合して活性な免疫複合体を形成をさせることができであろう。診断用においては、2つの異なる診断用抗原の存在がカクテル酵素試験を誘発し、両方の診断用抗体が検出されると、検出可能な診断用インジケーター抗体が検出される所見だ。インヒビンのA鎖とB鎖それぞれに特異的第一抗体結合部位、およびポーラスラディッシュペルオキシダーゼとグルコースオキシダーゼそれぞれに特異的な第二抗体結合部位を有する2つの2特異的抗体が使用されることができるので、インヒビンのA鎖とB鎖の存在下に、ターカースはグルコースオキシダーゼにより変換されて過酸化物を生成し、次にこの過酸化物は、オルトフェニルジアミンの容易に吸収可能な芳香族試薬と同時に、ペルオキシダーゼにより酸化されると活性結果が得られる場合に2つの異なる抗原部位が検出されなければならない結果の抗原構造を同じく、底性結果が得られる。

第一および第二抗体結合部位は、(i) 先兆検定において空試験をコートイングするため、共に2.0 mg/ml、青さしくは5.0 mg/ml をを超える高濃度の2種類のモノクローナル抗体の混合液で、親モノクローナル抗体を分離するヒューズ、および(ii) 第2特異的抗体に加えて、親モノクローナル抗体を分離するヒューズ、および(iii) 第2特異的抗体に対する結合部位を有し、均質に活性されるか、または化学的処理により活性化された2特異的抗体

例えば、その欠乏が現在の未熟児に起こる呼吸困難症疾患のリスクのインジケーターとなるS-P-A [Hattori et al. (1988) Am J Obs Gynecol 153] が既往であってもよい。この呼吸困難は全病死児の2%を占め、そして生後1週以内の換気不足の死因の一例的な原因である。

酵素は、例えば、全ての酵素が充分に活性化され、かつ容易に検出可能な酵素である、ターガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、カレーゼ、炭酸脱水素酵素またはホースラディッシュペルオキシダーゼであることができる。

本発明の他の組織によれば、酵素が抗体への結合により不活性となり、そして抗体の親抗原への結合の際に活性を再びして活性化される。抗原と酵素に対する結合部位を有する結合部位を有する多特異的抗体が提供される。この抗体は2特異的抗体であることが示されている。

本発明の他の組織によれば、S-P-A冷却および酵素に対する結合部位を有し、該酵素の抗体への結合は酵素を不活性にする多特異的抗体と試料と共に保持させ、その際S-P-Aの親抗原への結合が保持していた酵素の酵素から酵素を放出をもたらすこと、ならびに試料中のS-P-Aの存在を示す放出された酵素酵素の存在を検出することを含む。哺乳動物由来のS-P-Aの検出方法が説明される。この酵素は、ターガラクトシダーゼであることができる。

本発明の他の組織によれば、酵素および第1の酵素に対する結合部位を有し、該酵素の抗体への結合は酵素を不活性にする多特異的抗体と試料と共に保持させ、その際S-P-Aの親抗原への結合が保持していた酵素の酵素から酵素を放出をもたらすこと、ならびに試料中のS-P-Aの存在を示す放出された酵素酵素の存在を検出することを含む。哺乳動物由来のS-P-Aの検出方法が説明される。この酵素は、ターガラクトシダーゼであることができる。

本発明による検査方法はどれも、非特異的抗体がバイオセンサの生物学的感覚装置(biosensing device)として働くバイオセンサーにおいて実現されるために手の操作がかかることがある。現在までに、モノクローナル抗体を電極バイオセンサーに用いて、セトガナドトロビン(holothurin G.A. B.L. et al. (1987) Biotechnology 5, 147) および大腸中のヌクタイロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*) [Kirchhoff et al. (1990) J. Appl. Bacteriol. 69, 571] が検

により、提供される。初期導入(+)は細胞内形態導入であると示され、同時に前記(+)は細胞内形態導入であると示される。後記導入(+)は細胞内形態導入を含んでいる。

本発明の多官能性半胱氨酸は、2種類の目的存在するモノクローナル抗体の混合液、または未修飾2特異的抗体の複数の構成、例えば、並びまたは認由Gを用いたアフィニティクロマトグラフィーあるいはイオン交換またはゲルアリによる分離された免疫グロブリンを分離するための洗浄により、逐段的に合成されれる。

分子内状態感受性には、常に機械された2特異的または3特異的免疫グロブリンを必要とする。構成とする者の構成は、それぞれの抗体部位がそれに對して方向付けられた親抗体マトリックスを用いた、レーナンシルアルファニティクロマトグラフィー工程により合成されることができる。たって、多特異的抗体は、不活性化した酵素、治療用蛋白質または診断用分子を使用したクロマトグラフィーまたはイオン交換により精製される。

有用酵素の其のアフィニティクロマトグラフィーは、均質にする為の洗浄中に不活性化が多特異的抗体のイオノタイプ抗原決定基を保護する、不活性化したマトリックスを用いて合成される。

本発明の他の組織によれば、酵素中における活性の存在または不存在を判定するための免疫検定方法が提供されるが、その方法は、抗原をより酵素に対する結合部位を有し、酵素側の結合への結合が抗酵素を不活性にする多特異的抗体と試料とを接觸させ、その酵素活性部位の結合部位への結合が結合していた酵素酵素の活性を示す酵素からの酵素をたらすこと、ならびに試料中の酵素の存在を示す酵素された活性酵素の活性を測定することを含む。即ち、本発明のこの構成は1反応工程を含む簡単な免疫検定方法を提供する。

酵素による活性を望むものではないが、本発明からは、新たに結合した抗体と結合していない酵素との間の立体障壁が、抗体からの酵素の放出を引き起こすと確信している。従って、酵素は、目的酵素との立体障壁を防歯するように、本発明にはそのサイズに基づいて設計される。使用される抗体は、兎外に抗体を酵素で酵素と結合して、酵素が抗体の存在下で活性を減らすことがないようにするべきである。酵素は、その活性部位で抗体と結合することが好ましい。

出されている。しかし、検出用抗体は抗体結合部位の検定前に洗浄によって酵素されてしまううちがないことおよび酵素の再生にも問題があることから、一般的な適用は不可であると認明されている。本発明の方法は内在性酵素(integral enzyme)を使用するので、2特異的抗体は酵素および酵素活性部位を直接観察されることができる。例えば、酵素酵素またはイオン活性酵素酵素トランジスター(IESET)はグルコースオキシダーゼを結合した2特異的抗体を含むことができる。あるいは、酵素酵素または化成的酵素酵素酵素トランジスター(IESET)はウレアーゼを結合した2特異的抗体を含むことができる。

酵素を上げる検査の方法に用いられる多特異的抗体の選択の例を以下に記載するが、これには単に例示のためのみにすぎない。

ターガラクトシダーゼは充分に活性化されており、そしてその活性は容易に検出される。

グルコースオキシダーゼはアスペラギルス・ニテル(*Aspergillus niger*)から酵素に分泌され、1.8×10¹²の分子量を有する。グルコースオキシダーゼはマレノースを東洋に含む糖基でありますので、酵素活性を保持しながらマレノースの酵素を用いて交叉反応させて、複数の不活性酵素の酵素活性を増加させることができます(Koslitzki B. 等 (1987) Appl Biochem Biotechnol 5, 265)。グルコースオキシダーゼの分子量は化成性により調節することができます。グルコースオキシダーゼは、酵素電極の酵素成分として選択される。

ターガラクトシダーゼから安価に分離され得るウレアーゼは、分子量57000のDのモザイク(Chrysanthemum)であり、9.6×10¹²のサブユニット各々に1つクチ结合部位を備えている。ウレアーゼは酵素電極における酵素成分として供給される。

炭酸脱水素酵素は29×Dの比較的小い分子量を有する酵素である。炭酸脱水素酵素は二酸化炭酸の水和および炭酸水素根から水素を離脱し、そして水を遊離から遊離に分離される。

ホースラディッシュペルオキシダーゼは完全に活性化されたヘム部位を有する[Le Her C. et al. (1980) J Biol Chem 255, 8986]。ホースラディッシュペルオキシダーゼは、グルコースオキシダーゼにより活性化されホースラディッシュペルオキシダーゼの酵素として作用する過酸化水素による酵素活性を生じさせるために、グルコースオキシダーゼを第一活性に、かつホースラディッシュ

特表平6-506827(5)

ペルオキシゲーゼを第二抗体に備えた。2つの部位による免疫染色方法 (two-site immunocytochemistry) に用いることができる。

以下に、本発明による抗体の調製法およびそれらの使用方法を、単なる説明である限りで用いて説明する。まず、図面を簡単に説明する。

図1は、本発明による抗体の働きを説明している。

図2は、本発明による抗体の用法を説明している。

図3は、本発明による抗体から放出された酵素の活性を説明しているグラフである。

図4は、本発明による抗体から放出された酵素の濃度を説明しているグラフである。

図5は、本発明による抗体から放出された酵素の活性を説明しているグラフである。

図1に示される免疫グロブリンG型の2種類の抗体は、第1の抗体1.6をより第2の抗体1.5との結合にそれぞれ用いる第一結合部位1.2と第二結合部位1.4をもつ。第1の抗体1.6の第一結合部位1.2への結合は、結合していない第2の抗体の第二結合部位1.4からの放出を引き起こす。

図2に示される酵素活性において、2種類の抗体2.1は、目的物の分析部位2.6、例えばS P-A、なんばく等に容易に検出可能な蛋白質活性を示す酵素2.8、例えばエラーカラクトンシダードにそれぞれ方向付けられた第一抗体結合部位2.2と第二抗体結合部位2.4を有する。この酵素2.8は、第二結合部位2.4で酵素を結合しているときには、例えばその活性部位または活性部位近傍の結合、あるいは結合部位の立体構造の変化による結合により、不活性化されている。

試料から第一結合部位2.2への分析部位2.6との結合は、前記分析部位2.6の存在を示す酵素2.8の活性が容易に検出される場合や、結合していない酵素2.8の活性を引き起こす。

図2.17で示される酵素活性において、2特異的抗体3.0は、草酸鉄の表面上の抗体1.5および抗凝固原3.3にそれぞれ方向付けられた第一および第二結合部位3.2、3.4を有している。前記酵素2.8は、第二結合部位3.4で結合しているときに不活性化されている。前記酵素3.0の第一結合部位3.2への結合は、活性部位を発現する結合部位に対して作成し得る活性部位での結合を引き起こす。

メトトレキセートを、抗原（酵素）提示の際の免疫原性を強調させるために用いたアルブミンと連結する。免疫化のために、次の形態で、あるいは免疫原性を強化するためにキーホールリビットヘモシアニンとの複合体として、酵素を作用する。

免疫した日本白鼠にマウスの酵素細胞をマウスのS P-2/0骨髄細胞に細胞融合することにより、ハイブリドーマを培養する。まず最初に、ハイブリドーマを、過剰の抗原またはメトトレキセート結合体に曝露して、酵素結合免疫吸収液（ヒトIgA）によりクレーンシングする。次に、酵素に対する抗体を分離するクローニングハイブリドーマにより生産されるモノクローナル抗体は、酵素結合介在器質免疫活性をプロックする能力でスクリーニングする。そのような活性をプロックする能力を有するモノクローナル抗体は、酵素の活性部位またはその近傍で結合することによりそのように働くものと考えられる。メトトレキセート反応性抗体を、メトトレキセートの酵素活性部位をブロッケする能力でスクリーニングする。

次に、細胞をモノクローナル抗体を包被するハイブリドーマを免疫培地で培養して、ヒューズマー生産に適した酵素活性クローナーを分離する。

ヒューズマー生産に適した酵素活性クローナーを同発育るために、2つの差別可能なマーカーを接種する。5 μg/ml のヒトオグアニアニンの存在下にハイブリドーマを培養し、ビオサンチングアミニンホスピルトランスクレーターで免疫活性を監視する。

オグアニアニン活性を陰導するためには、4 × 10³個のハイブリドーマ細胞を 6 × 48ケルの組織培養用培养瓶内に分けて育てたが、これらのウエル内には 30% (v/v) 細胞不活性化ウシ胎仔血清 (FCS) を含むアルブミン培養液地 [Stamper et al., Ehrlich C and Green R 1972, Nature, Vol. Biol. 230, 523, J. Immunol. 107, 540]、および 5% (v/v) のヒトオグアニアニン (Sigma 44600) が含まれていた。はぼう過濾後、免疫活性クローナーのクローナー活性が観察された。クローナーをベッティングによりリエルから取り出し、そして熱凍乾燥した。抗体の分離を実験し、酵素活性を測定した。次にこれらの実験を、酵素HABA免疫システム [Lindesmith L.H. (1964) Science 145, 703] により実験する。

2色の放出を引き起こす。

図2.17に示される酵素および酵素を組み合わせた用途においても、2つの異なる2特異的抗体4.0、4.2が使用される。抗体4.0は酵素結合部位4.4および不活性化部位で結合する抗体4.6に対する特異性を有している。抗体4.2は、抗体溶出液4.8ならびに酵素4.6または酵素の反応性化合物に対する特異性を有している。前記抗体4.4の抗体4.0への結合は、活性を示す他の酵素結合部位4.6の放出を引き起こす。この放出された酵素の活性は容易に検出される。次に、前記酵素4.6またはその反応性化合物の1つが第二の抗体4.2に結合し、それにより抗体4.8の放出が引き起こされて抗体4.4を発現する酵素活性を示す。

2特異的抗体はハイブリドーマ細胞融合により簡単に調製することができる。

最初に、親細胞をノモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞が形成され、そして活性付けられる。次に、親細胞系が種々の活性部位における生長による酵素活性を発現させられる。これらの酵素活性クローナーは、次いで、異なる2種類の抗体結合部位の所の、あるいは親細胞系ハイブリドーマと免疫マウス由来の酵素活性との間の競争結合によると特異的抗体を用いて使用される。親細胞結合および酵素活性の結合部位を有する酵素活性化合物のためにスクリーニングされる。選択された酵素活性はフローラー化され、そして免疫検定により、このヒューズマーによる2特異的免疫グロブリンの分離が確認される。

本発明の使用において、分離される免疫グロブリンは蛋白質アフィニティクロマトグラフィーにより選択される。次いで、選択された抗体がシーケンシャルアフィニティクロマトグラフィー工程に掛けられて、均質な2特異的免疫グロブリンが分離される。

2.特異的抗体の調整

ル： 選択されたモノクローナル抗体を分離するハイブリドーマの細胞

2特異的抗体はヒューズマー技術により寒天に固定して調製される。

最初に、モノクローナル抗体を分泌する細胞系を、目的的酵素および細胞表面抗原メトトレキセートに対して分離する。

高濃度細胞もまた、哺乳動物細胞のナトリウム・カリウム ATPアーゼを経由する心臓細胞であるウバイン (oubain) の濃度を増加させた培地における活性により選択する。ウバインの存在下では新生細胞は死んでしまうが、既存クローナーは 1% オホルト (fetal bovine serum) を含む再生細胞中で生存することができる [Hunkovitch R et al. (1974) Cell 1, 221]。

ウバイン耐性を選擇するために、2.1% のウバインハイブリドーマを培養し、そしてアルファMを以て、1.0 容 (v/v) FCS を含む 1 mM から 0.5 mM まで増加させた濃度のウバイン (Sigma 09125) を含ませた培地でハイブリドーマを培養培養した。

2. 製造用 (即ちウバインおよびオガニアニン) 濃度を調節するのに、上記と同様に増殖させた細胞のウバイン中で細胞を生長させた。ひ、5% のウバイン培地中での生長が可能となった細胞に、上記と同様にしてヒトオグアニアニンに対する酵素活性を調節した。

6-ヒドロキシアミニンおよびウバインにかかる耐性を有するハイブリドーマを、ヒューズマーの生長のためにクローニングした。

ロ： ヒューズマーの発生

一連の細胞融合過程における標準法により、2特異的抗体を分離するヒューズマーを生産し、酵素活性結合手 (enzyme-reactive site) および目的的細胞を認識する高濃度結合部位を備える 2特異的抗体を生産するヒューズマーを選択する。ヒューズマーを、免疫マウスの免疫細胞またはハイブリドーマである“酵素活性結合細胞”、および“抗原度活性結合”から構成する抗原度活性細胞の細胞、4.5 × 10³ 個の蛋白質アリゲーションを認識する抗体 K-11、80OKD カイオーネリビットヘモシアニンを認識する抗体 K-111、ならびに次方英にヒト細胞面活性物質アボジド A (SPA) と反応する抗体 K-14 および K-18 [Rendle SJ et al. (1992) 連続中] を生産する細胞を含むしている。抗体 K-14 は、クロキラの抗体 [Harrel Y et al. Ann. J. Pathol. 1986 123: 25-33] に認識された抗体 P-E 10 に認識しているものと抑えられている。下記に示す目的の実験により細胞融合実験を実施する。

特表平6-506822 (6)

第一組： 肺原反応性または肺部反応性でありナガクアニンに耐性を有する感染性ハイブリドーマと、肺部反応性または肺部反応性の免疫マウスの脾臓細胞との融合、および細胞融合細胞の純化法。

第二組： 肺部反応性または肺部反応性のどちらか一方であるチオグアニン耐性ハイブリドーマと、該ハイブリドーマが肺部反応性であるときには肺部反応性でありその他の場合には肺部反応性であるウツバイン耐性ハイブリドーマとの融合、および融合細胞のウツバイン・チオグアニン培地による選択。

第三組： 肺部反応性または肺部反応性のどちらか一方であるチオグアニン/ウツバイン2種耐性ハイブリドーマと、該ハイブリドーマが肺部反応性であるときには肺部反応性でありその他の場合には肺部反応性である肝生型ハイブリドーマとの融合および致死性細胞の純化法、ウツバイン培地での選択。

細胞融合は標準的な技術により実施する。チオグアニン耐性ハイブリドーマを免疫マウス由来脾臓細胞とそれぞれ1:10の細胞比率で混ぜし(第一組)、そして加温洗浄培養槽中で50% (v/v) ポリエチレンギリコールを500の倍率下に7.5時間インキュベートすることによりヒューバーを調整する。細胞融合率を、粗融合合存率が既知の一定時間後の吸光度により算出させる。次に、ヒューバーをマルチウェル培養瓶内に80%以上の割合で種々として種々、そして2週間に亘って10%の濃度で培養する。

異なる細胞株をマーカーとして2種類の手順を用いるハイブリドーマの融合によりヒューバーを生成するとき(第二組)には、融合に先立ち1:1の比率で脂溶性色素を混合する。脂溶性色素は脂溶性を有する染料で50% (v/v) ポリエチレンギリコール70%の存在下に7.5時間実験する。この反応は、一定の速度で1/2分間にわたる融合活性化の増加により終了させる。得られたヒューバーは、マルチウェル培養槽内で200の別の細胞として、5 ug/ml チオグアニンと0.5 ml M WAツバインを含有する致死性細胞に植える。37°Cにて5% (v/v) CO₂空気中で2週間インキュベートした後、培養を調査する。

2種耐性細胞ハイブリドーマと肝生型ハイブリドーマとの融合によりヒューバーを生成するとき(第三組)には、融合に先立ち1:1の比率で脂溶性色素を混合する。融合細胞は、脂溶性色素を含む約1/2ボリエチレンギリコール1:50の存在下に7.5時間実験する。この反応は、一定速度で1/2分間に亘って10%の濃度で2週間に亘って10%の濃度で培養する。

細胞融合活性度を測定するために2つの異なる方法で実施する。第一組目の方法では、抗体を1/2分間かけて添加し、その上澄みを取り出し、そして次の上の上澄みを抽出して前記複合体から放出される脾臓細胞の存在を調べる。第二組目の方法では、同時に行われる工程式において、脾臓細胞を抗体と同時に細胞融合液に添加する。両方の場合において、試験中の状況の存在を示す結果説明に伴う色の変化により、融合活性を直接的に判定する。

例えば、赤血球溶血性分離により精製された脾臓細胞粗葉アボットA [Katalyst SL and Syphax (1979) Lab Invest 39:593] を用いて、測定の精度を引く。そして、未熟分離から供給された牛乳試料のアボット蛋白質を指定する。

効率的赤血球質膜蛋白質を認識する2種異性抗体

ヒューバー細胞培養GAL3.0.19は、SPA-Aと大腸菌*Escherichia coli*由来の β -ガラクトシダーゼとに反応する2種異性の免疫グロブリンを免疫する。この粗細胞系は、 β -ガラクトシダーゼのハイブリドーマ(Randall et al. 1992 種録中)のサブクローニングでありSPA-Aと疾患する抗体を分泌するD47.19と、ミオケバパンジュバントに発現された免疫活性化抗 β -ガラクトシダーゼ(Siggen 1993)で右側面に風車形で固定された β -ガラクトシダーゼを前記マウスの脾臓細胞内に4倍稀釈した。

細胞融合は標準的な技術により実施し、そして折られた細胞混合液をHAT培養槽中に植えた。培養物を17日後にスクリーニングした。73.4%ヒューバー細胞が得られ、その内の41.4%が β -ガラクトシダーゼと反応する抗体を分泌することが確認E/Sの1人により判明した。ウエスタン免疫プロットにより測定したところ、各半量荷がSPA-Aと β -ガラクトシダーゼとの双方と反応する免疫グロブリンを分離した。これらの荷物を、固定布張によりクローン化し、そしてさらなる研究のためにクローンの篩選を進めた。これらのもクローンの細胞系の1つがGAL3.0.19である。GAL3.0.19の既得はグレード1級の効率的抗体に當たる。

たる並得多管培養の添加により終了させる。ヒューバー細胞は、マルチウェル培養瓶内さ200の別々の培养として、0.5 ml M WAツバインを含有するHAT培養槽中に植える。

次に培養液を前記群英坐ほメトトレキセートの初期でスクリーニングする。そして、免疫活性細胞を底板された胚芽の組織に関して試験する。培養物を、前記細胞を免疫吸着後定法(E/S法)により、選択された胚芽と反応する抗体の分離でスクリーニングする。ウエル盤たりうるよりD.34共融接液法($\text{pH} 9.5$)中に置いてまで一液インキュベートすることにより、7~10 minの精度で90%~ウエル培養瓶上に抗体と不融合する。10% (v/v)ウシ胎仔血清を含むリソマリ酸塩蛋白質液(PBS)をウエル当たり1 mlに加えて、蓋板で2時間で2回に亘って培養液をブロッケンした。試験された胚芽上覆みを、ウエル盤たりうりで更換して培養に供し、そして逐滴で1時間インキュベートする。この培養液を0.05% (v/v)ソイーン20を含むPBSで洗浄し、次いで、第二層液中に結合した抗マウス免疫グロブリン抗体を用いて、群衆医薬品の過剰な抗体により結合抗体を除去する。次いで、2種異性の抗体を分泌すると同時に抗体活性を底板液および単相粗細胞の標準的な技術によりクローン化して、ミニグラム量の抗体の部分免疫グロブリンを生産するために培養する。そして分離された抗体を、イオン交換クロマトグラフィーにより活性付与し【Hong JT and Colvin RG (1987) J. Immunol. 138: 1345】。実際的診断に使用するために精製する。免疫底板においては、免疫グロブリンの精製のためにアフィニティクロマトグラフィーを用いた。

抗体の性質

ヒューバーにより分泌される2種異性の免疫グロブリンまたは過剰免疫グロブリンを、ELISA法で定量法でインキュベートしてマルチウェル培養槽上に不動化する。底板液は、10% (v/v) PBSを含むPBSでブロックする。次に、前記抗体を群衆医薬品中でインキュベートすることにより群衆医薬品を結合させ、そして免疫グロブリンを生産する。

動物細胞培養コレクション【the European Collection of Animal Cell Culture, Porton Down United Kingdom】に配達されている。

この精製系は、アルブミンヨードを底板中で横屏の方法にて結合され、保持しない細胞株を生産せんにおいて、1 ml 当たり100万の免疫グロブリンを生産する。

濃縮GAL3.0.19免疫グロブリンを底板Aセファロース(Sigma P3881)を用いた粗細胞のアフィニティクロマトグラフィー技術により分離した。底板に当たる粗細胞は、精製液上清液1:2.1を1 ml トリス緩衝液($\text{pH} 8.5$)の添加によりpH 8.5に調整し、そして1:1の底板Aセファロースカラムに通した。1 ml トリス緩衝液($\text{pH} 8.5$)の添加によりpH 8.5に調整した。1 ml 10倍の蛋白を1 ml トリス緩衝液($\text{pH} 8.5$)7.0 mlに1により粗らに中和した。この粗濁部分の蛋白濃度をクーマシーブル(Coummassie Blue)色調染色後液により測定し、かつ同様にELISA法により活性を測定した。精製液は1:2.1から1:2.5倍の免疫グロブリンが分離された。最も精製された蛋白の粗濁E/Sの活性は、 β -ガラクトシダーゼに対する1:10⁴、そしてSPA-Aに対する1:10⁴であった。

β -ガラクトシダーゼとSPA-A双方の認識を示す抗原複合

濃縮GAL3.0.19を抗原複合E/S法方式に用いて。 β -ガラクトシダーゼとSPA-Aを検出することができる。底板に説明すれば、底板水溶性蛋白質液($\text{pH} 9.5$)をウエル当たり50 mlに用い、底板1 ml 当たり100万の免疫グロブリンを含有して β -ガラクトシダーゼとSPA-Aを含有するFCSを含むPBSをウエル盤たりうり1 mlに用い、培養液を室温で2時間ブロッケンした。

β -ガラクトシダーゼ底板液：

特表平6-506827(7)

0から100 µg/ml の濃度のβ-ガラクトシダーゼを50 µl に容積がつ瓶に充し、室温にて1時間インキュベートした。0.5% (v/v) ツイーン20を含むPBS 200 µl を混じてウエルを2回洗浄し、そして結合P-ガラクトレダーゼを酵素液質である“β-ガラクトシダーゼ活性測定液”的添加により抽出した。この基質液質は、速やかに加温しながら0.1 ml リン酸緩衝液 (pH 7.3) 1 ml に溶解したD-ニトロフェニル-α-D-ガラクトビラノシド (Sigma N-127; DNPG) 20.5 µmol を含む。OMPの浴液 83.2 µl にシリコン油被覆液 5 ml に溶解したが、この洗浄液は、ウシ血漿アルブミン (6.6 g) と塩化マグネシウムを下記の割合:

2.7 ml 0.1 M ピリドリリン酸緩衝液:

6.5% (w/v) ピリドリリン酸を含む0.1 ml 0.03M 酸化マグネシウム、できあがめていた。抗原捕獲方式において、0.1 ml 1 m に当たる5 µmol のβ-ガラクトシダーゼを検出した。

S-P-A 検査結果:

5~100 µg/ml の濃度のS-P-Aを50 µl に混じ、室温で1時間インキュベートした。ウエルをツイーン20を含むPBSで2回洗浄し、そして結合したS-P-Aを、PBS中に1.5G E-6ビオチンのウニカル結合50 µl の添加により抽出した。E-6ハイブリドアーマーは、D-4と異なり、S-P-Aの第二エピヘドと反応するモノクローナル抗体を分離する [Handle et al 1992 (英訳本)]。E-6免疫グロブリンは、免疫グロブリン構造を構成する3ビオチン分子の結合で識別される (即ちE-6-オキサンは1 m に当たる1 mgに希釈されていた)。30分間のインキュベーションの後、培養液をツイーン20を含むPBSで2回洗浄し、そして次にウニカルを4°Cで50分間、PBS中に1:5000アビジン-アルカリホスファクターゼ 50 µl とインキュベートした (PBS中にで5 µl 当たり) 並びに酵素 (Sigma A2927)。ウエルをツイーン20を含むPBSで3回洗浄し、そして次にアルカリホスファターゼの溶液を、当量濃度、即ちパニトリトロフェニルホスフェートの六水和物・ニナドリウム (Sigma 104-105E) への変換により抽出した。隠然に説明すれば、ウエル当たり50 µl の溶液、即ちアルカリ

ホスファターゼ活性を1 ml ジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.6) 1 ml に当たる1 ml まで増加した。アルカリホスファターゼ基質液質は、ジエタノールアミン 1.2 ml 、水 8 G 0.6 l 、酸化マグネシウム水和物 1.0 g に水から溶かし 0.1 (v/v) ジエタノールアミン緩衝液を含んでいた。1 ml 液質を溶液の半分が9.6となるまで溶解し、次に水を添加してその体積を1リットルとした。使用するまで4°Cの冷蔵にて貯蔵した。酵素による基質液質は、4.3 ml 中における光吸収の変化により検出した。この抗原捕獲方式を用いたときに、Gム3.0-1.9は最小限も、2.5 µg/ml のDNPGを検出することができた。

Gム3.0-1.9によるβ-ガラクトシダーゼ活性のプロック

1 ml/ml の濃度のAL30.1.9免疫グロブリン 50 µl をβ-ガラクトシダーゼの活性を抑制する量より添加して50.0 µg/ml の濃度とした。これにタ-ガラクトシダーゼを基質 1.0 g/ml で溶解して4.7 ml 中にかける光学密度で活性質液質を監視した。抗原捕獲の代わりに PBS 50 µl を用いた待機液質も平行して実験した。5分間後、試験液質中の酵素活性物質の光学濃度は、液体の不透明度では0.920、そしてAL30.1.9の存在下では0.597であった。このことから、GAL30.1.9がβ-ガラクトシダーゼの酵素活性をプロックすることを示唆している。

印加法のためのS-P-A 3.0-1.9免疫グロブリンの精製

均質なS-P-Aを精製するため免疫グロブリンを、シーケンシャルアフィニティクロマトグラフィーにより過剰抗体から分離した。過剰抗体はシーケンシャルアフィニティクロマトグラフィーであつた。第一抗原部位を含有する免疫グロブリンを、精製各P-Asを用いるビードマトリックスを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより分離した。溶液は原液約1 M ジエタノールアミン (pH 5.1) を用いて行い、そして蛋白質は1 M トリス緩衝液 (pH 8.0) にて中和した。中和した蛋白質をGムセファデックス (南恩) 伊通を用いてP-Asに接種後交換して“脱脂”した。この脱脂を次に、タ-ガラクトシダーゼを吸着するビードマトリックスをグルマ

トリックスが保持しているクロマトグラフィーグルを用いた第二のアフィニティクロマトグラフィー工場で洗浄した。D-4と同様に洗浄し、均質な2種類の抗体を解離し、そして0.02%アグドを含むPBS中に、洗浄時まで4°Cにて貯蔵した。クロマトグラフィーの完了時には、過剰免疫グロブリン 2.7 ml から初期の免疫グロブリン 0.3 ml が得られた。最も濃縮された部分の純度活性はβ-ガラクトシダーゼに対しては1:100、S-P-Aに対しては1:100であった。GAL30.1.9の粗抽出及び洗浄の過程は、粗抽出液を透析池中下における10% (w/v) SDS-PAGE電気泳動により確認した。

抗体導入液の形成挙げの明示

抗体導入液の組成は、蛋白質Aアフィニティクロマトグラフィーにより分離された濃度はAL30.1.9免疫グロブリンと、S-P-Aセラフロースおよびβ-ガラクトシダーゼセラフロースによるシーケンシャルアフィニティクロマトグラフィーにより活性化から内変化して分離した粗抽出液グロブリンとの双方により明示された。

技術第1. 洗浄免疫グロブリン検定 (図3参照)

ELISAコートリング器液質である洗浄液を基礎液質 (1 ml H.T. 6) をウエルに当たる50 µl に用い、洗浄液 1 ml に当たる5 ml まで、濃度GAL30.1.9免疫グロブリンを4°Cにて一時間インキュベートして容器背面をコートイングした。1.0% (v/v) TGSを含むPBSをウエルに当たる50 µl に用いて、容器背面を底面で2時間ブロッキングした。次に、ウエルを、0.5% (w/v) のカセイ (Sigma A7580) 2 ml/PBSを洗浄液質 1 ml に当たる2.0 µl のβ-ガラクトシダーゼを含む液質 50 µl と室温で1時間インキュベートした。次いで、ウエルをD.O.を5 (v/v) ツイーン20を含むPBS 20.0 ml にて2回洗浄し、不動化した粗抽出液体複合体から未結合蛋白質を取り除いた。

次に、洗浄液質で希釈した、S-P-A 1.0 g/ml の増強した濃度の、特異的抗体S-P-A、分子量800 kD (グルトン) の非特異的抗体にしおり、ガム

粗抽出液 1.0 ml の非特異的抗原 1 g/ml であるマウス免疫グロブリンを、5 ml に希釈して液質としてウエルに充填した。1 ml 分離液にその上端みを取り出して、タ-ガラクトシダーゼ活性質液質により、複合体からの酵素の放出を評価した。純度50 µl の酵素をタ-ガラクトシダーゼ活性質液質 50 µl とインキュベートした。活性から生肉塊への反応は、酵素液質中に放出された酵素の存在を示す。4.10 ml における光学密度により算定した。

非特異抗原からの酵素の放出は、タ-ガラクトシダーゼ活性質液質、および4.10 ml における活性質液質活性の測定により、前記上液み中で測定され、1.200 kDグルトンの分子量を有するS-P-Aのみ在下でのみ酵素が放出され。放出する分子量の活性であるK.M (800 kD) およびI.K.M (1.000 kD) の存在下では酵素は放出されなかつた。この結果は確定することができ、そして高濃度のS-P-Aにおいて粗抽出液が記述された。

この方法では、GAL30.1.9免疫導入液質は、最小限 0.25 µg/ml のS-P-Aを検出する。

実験例2. 特異的抗体の免疫グロブリン定量

特異的抗原の存在下に、酵素の放出が明示された (図4参照)。

ELISAコートリング器液質である洗浄液を基礎液質 (1 ml H.T. 6) をウエルに当たる50 µl に用い、洗浄液 1 ml に当たる5 ml まで、濃度GAL30.1.9免疫グロブリンを4°Cにて一時間インキュベートして容器背面をコートイングした。酵素液質を、1.0 ml (v/v) FCSを含むPBSをウエルに当たる5 ml に用いて室温で2時間ブロッキングした。次に、ウエルを、0.5% (w/v) ウシ血漿アルブミン (Sigma A7688) を含有するPBSを洗浄液質 1 ml に当たる2.0 µl のタ-ガラクトシダーゼを含む液質 50 µl と室温で1時間インキュベートした。酵素液質も不動化した粗抽出液体複合体から取り除いた。

次に、洗浄液質 1 ml に当たる6.25~100 µl に希釈した濃度範囲の特異的抗体S-P-AおよびS-P-Aに近く分子量の非特異的抗原にしおり、ガム

ガラクトレダーゼ活性測定により前記混合物からの酵素放出を評価した。

測定は説明すれば、試験管10 mlをB-ガラクトシダーゼ基質濃度50 μMとインキュベートした。基質から生成物への変換は、前記上段の酵素の存在を要す。410 nmにおける光学密度により測定した。前記導入複合体から酵素が充分に放出されたのは、特異的抗原G-P-Aの存在下においてのみであり、よく観た分子量の低減なしとの存在下では充分に放出されなかつた。

実験例3. 特異的免疫グロブリンを用いた1工程技術的介在酵素導入検出(図2参照)

前記導入複合体を作成し、ツイーン20を含むPBSによる2回の洗浄により培養液から未吸着B-ガラクトシダーゼを洗い出した。次に、特異的抗原抗原と同時にに行われる酵素放出を、下記の通り明示した。

前記導入複合体1 ml当たり6.25~1.9G μMに希釈した。添加した酵素の特異的濃度G-P-AおよびG-P-Aに近く既知分子量の非特異的抗原KELT片を50 μMを量づつ加えし、B-ガラクトシダーゼ基質濃度50 μMを加えと混合をした。次いで、抗原とB-ガラクトシダーゼ活性の混合液を100 μlも、不動化した酵素導入複合体を含むウェルに添加した。前記複合体からのB-ガラクトシダーゼの放出による酵素活性を、酵素に付与された生成物形成により当る色の410 nmにおける光学密度により判定した。

些微の活性は、試料は加温後(0°)とその10分間後(10°)に測定した。その双方の場合において、G-AとG-P-Aにより認識される特異的抗原G-P-Aの存在のみが、充分な生成物形成をもたらした。この結果は、G-AとG-P-Aの両者の活性が、活性な生成物形成をもたらした。この結果は、G-AとG-P-Aの両者の活性が、活性な生成物形成をもたらしたことを明確に示している。

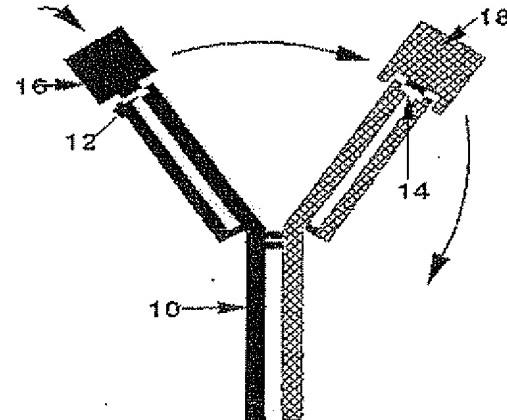


Figure 1

Figure 2

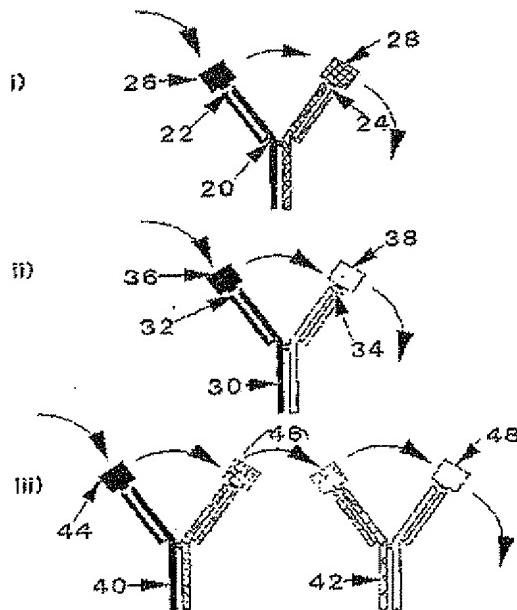
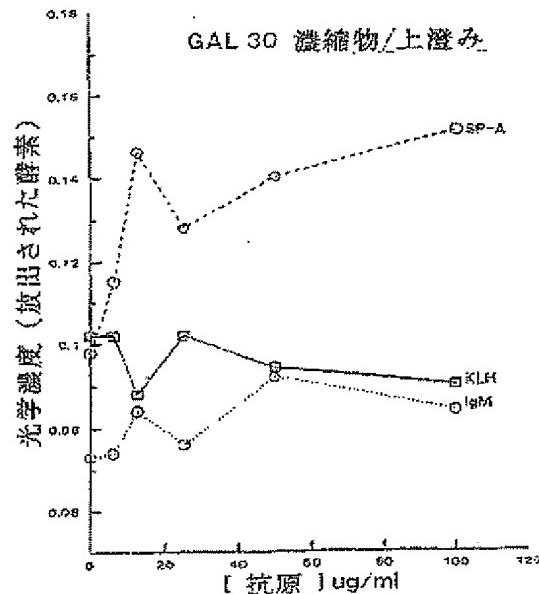


Figure 3



特表平6-506827 (9)

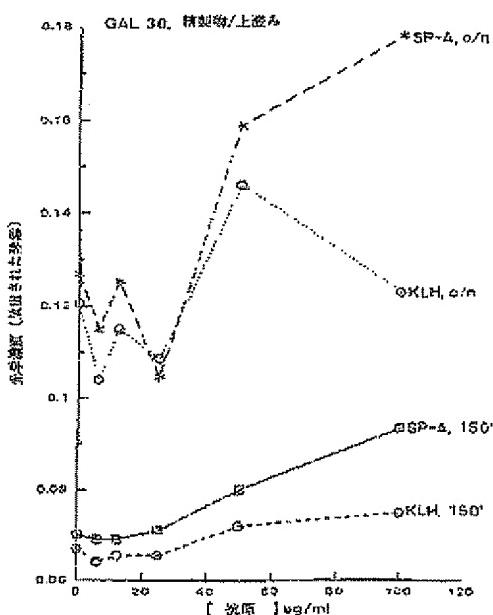
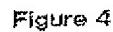
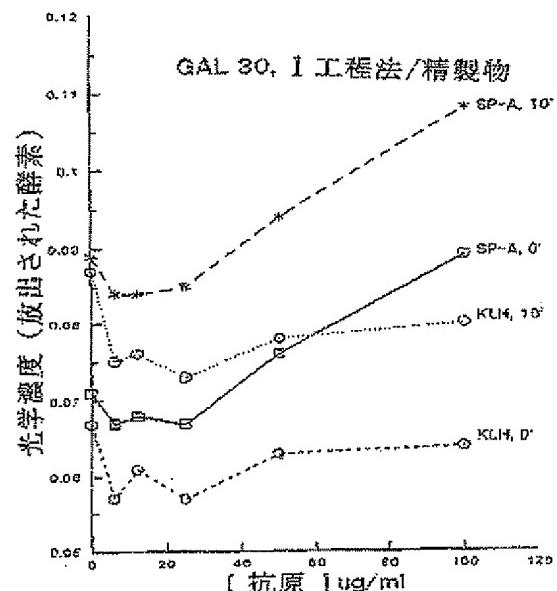


Figure 5



| RECEIVED IN THE LIBRARY OF THE INSTITUTE OF POLYMER SCIENCE OF THE UNIVERSITY OF DELAWARE | | SEARCHED INDEXED SERIALIZED FILED | REF ID: A6200769 |
|--|--|--------------------------------------|------------------|
| A | EP-A-0 090 463 (E) I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY 23 December 1992 see the whole document *** | | 1-34 |
| A | JOURNAL OF POLYMERIC LETTERS vol. 17(1), 1989, NEW YORK, NY paper by: W. B. M. DE LAU ET AL: "Introduction of hydrophilic hydrogels based on RAFT-precipitation method" cited in the application see the whole document *** | | 1-34 |
| A | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA vol. 83, October 1986, WASHINGTON US pages 7309 - 7323. R. R. SHRESTH ET AL: "Advantages of RAFT-like hydrogels in <i>in-situ</i> heteropolymerization and their applications" cited in the application see the whole document *** | | 1-34 |
| P.A. | W.P. 2,192,234 (TAIKISHO CHEMICAL INDUSTRIES, LTD, JAPAN) 27 June 1991 cited in the application see the whole document *** | | 1-36 |
| A | EP-A-0 029 324 (MITSUBISHI KUMARASAWA) 23 August 1992 *** | | |

国際特許登録

G 020324

SA 50594

国際特許登録

G 020326

SA 50594

本件は、日本特許庁の登録出願として、昭和50年6月26日付で、第506827号として登録出願がなされた。本件は、日本特許庁の登録出願として、昭和50年6月26日付で、第506827号として登録出願がなされた。

本件は、日本特許庁の登録出願として、昭和50年6月26日付で、第506827号として登録出願がなされた。本件は、日本特許庁の登録出願として、昭和50年6月26日付で、第506827号として登録出願がなされた。

| 登録登録番号 登録登録番号 | 登録登録日 登録登録日 | 登録登録者 登録登録者 | 登録登録者 登録登録者 | 登録登録者 登録登録者 |
|------------------|----------------|--|---|--|
| 50-A-0301579 | 27-10-63 | AU-A- AU-A- CA-A- CN-A- DE-A- ES-A- EP-A- EP-A- EP-A- EP-A- | 550456 1555903 1813447 0105624 0105625 2126031 2158529 2159521 2159520 2159522 | 10-03-66 04-11-63 28-10-66 27-10-66 10-03-66 02-03-66 01-07-60 27-07-66 27-07-66 19-03-68 |
| 50-A-2116992 | 23-07-66 | AU-A- AU-A- CA-A- CN-A- DE-A- ES-A- EP-A- EP-A- EP-A- EP-A- | 550406 1555902 1213239 622750 0105350 2158531 2159530 2159529 6012276 0202179 | 20-03-65 04-11-63 28-10-66 27-10-66 10-03-66 02-03-64 02-03-64 02-03-64 10-03-66 10-03-66 10-03-66 |
| 50-A-5007234 | 22-07-90 | AU-A- AU-A- | 2159539 0245052 | 01-03-93 ED-28-93 |
| 50-A-0361926 | 01-04-93 | AU-A- VS-A- | 6402939 02532350 | 10-03-93 02-04-93 |
| EP-A-0163712 | 10-04-90 | JP-A- JP-A- | 3101375 #127450 | 10-04-93 05-04-90 |
| EP-A-0094663 | 21-10-63 | JP-A- JP-A- JP-A- JP-A- | 1445252 1479597 1594458 1828339 6470528 | 02-03-64 20-10-64 01-10-65 20-10-65 10-03-66 |
| EP-A-5169134 | 21-04-81 | None | | |
| EP-A-0229104 | 23-08-89 | JP-A- | 21N2913 | 12-08-90 |

| 登録登録番号 登録登録番号 | 登録登録日 登録登録日 | 登録登録者 登録登録者 | 登録登録者 登録登録者 |
|------------------|----------------|-----------------|----------------|
| 50-A-0229104 | 21-04-81 | US-A- 570551 | 21-04-81 |

フロントページの続き

(51) 国, CI, §
 C I 2 M 1/34 F 7229-4B
 C I 2 N 5/20
 15/06
 G O 1 N 33/536 Z 8310-2J
 //C I 2 N 5/20
 C I 2 R 1/91)

(81) 指定国 E P (AT, BE, CH, DE,
 DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N
 L, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM
 , GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AT
 , AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS, DE,
 DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, L
 K, LU, MG, MN, MW, NL, NO, PL, RO
 , RU, SD, SE, US